

# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

15 February 1999 (15.02.99)

International application No.

PCT/DE98/01797

Applicant's or agent's file reference

K 2564 - sch/msl

International filing date (day/month/year)

24 June 1998 (24.06.98)

Priority date (day/month/year)

24 June 1997 (24.06.97)

Applicant

KÜPPER, Jan-Heiner et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 January 1999 (22.01.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Christelle Croci

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2478179

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2564 - sch/msl</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/ 01797</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>24/06/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>24/06/1997</b>
Anmelder  <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
  - ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

**IDENTIFIZIERUNG KANZEROGENER AGENZIEN DURCH SÄUGETIER MIT HEMMUNG DER POLY  
(ADP-RIBOSE) POLYMERASE**

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 

Abb. Nr. 1 ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2564 - sch/msl</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/01797</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>24/06/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>24/06/1997</b>
Anmelder  <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

- ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
- ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
- ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

**IDENTIFIZIERUNG KANZEROGENER AGENZIEN DURCH SÄUGETIER MIT HEMMUNG DER POLY  
(ADP-RIBOSE) POLYMERASE**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

- Abb. Nr. 1
- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
  - ☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☐ keine der Abb.

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/00 A01K67/027 C12Q1/68 C12N9/10 C12N15/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;BUERKLE ALEXANDER (DE); ZUR HAUSEN HARALD ( ) 20. Juni 1996 siehe das ganze Dokument ---	1
A	KÜPPER, J.H. ET AL.: "Trans-dominant inhibition of poly(ADP-Ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-Nitro-N-nitroguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 15, Nr. 6, Seiten 3154-3163, XP002090237 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument --- -/--	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KÜPPER, J.H. ET AL.: "Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribose)ation potentiates carcinogen-induced gene amplification in SV40-transformed Chinese Hamster cells " CANCER RESEARCH, Bd. 56, Nr. 12, 15. Juni 1996, Seiten 2715-2717, XP002090238 MD US siehe das ganze Dokument ----	1
A	MOLINETE, M. ET AL.: "Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells" EMBO JOURNAL, Bd. 12, Nr. 5, 1993, Seiten 2109-2117, XP002090239 EYNHAM, OXFORD GB siehe das ganze Dokument ----	1
A	DE 44 33 130 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21. März 1996 siehe das ganze Dokument ----	1
A	WO 95 24379 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;GRIFFIN ROGER JOHN (GB); CALVERT ALAN HI) 14. September 1995 siehe das ganze Dokument ----	1
A	EP 0 757 102 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 5. Februar 1997 siehe das ganze Dokument -----	1

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01797

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9618737	A	20-06-1996	DE	4444949 C	21-11-1996
			EP	0871742 A	21-10-1998
			JP	10510160 T	06-10-1998
DE 4433130	A	21-03-1996	WO	9608571 A	21-03-1996
			EP	0726959 A	21-08-1996
			JP	9507757 T	12-08-1997
WO 9524379	A	14-09-1995	AU	693167 B	25-06-1998
			AU	1856595 A	25-09-1995
			CA	2184747 A	14-09-1995
			CN	1143358 A	19-02-1997
			EP	0749415 A	27-12-1996
			EP	0879820 A	25-11-1998
			JP	9510704 T	28-10-1997
			US	5756510 A	26-05-1998
EP 0757102	A	05-02-1997	AU	6739896 A	05-03-1997
			CA	2200496 A	20-02-1997
			WO	9706267 A	20-02-1997
			EP	0795019 A	17-09-1997

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SCHÜSSLER, Andrea  
Truderinger Strasse 246  
D-81825 München  
ALLEMAGNE

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

11. 03. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
K 2564 - sch/msl

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE98/01797

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
24/06/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
24/06/1997

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung  
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Digiusto, M

Tel. (+49-89) 2399-8162



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 23 MAR 1999

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2564 - sch/msl	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01797	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24/06/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/06/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  22/01/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  18.03.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Hoesel, H  Tel. Nr. (+49-89) 2399 



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01797

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-9 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-9 ursprüngliche Fassung

### Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1 - 9
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1 - 9
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 9
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**SEKTION V:**

1. Das anspruchsgemäße Verfahren zur Identifizierung von kanzerogenen Substanzen bzw. die anspruchsgemäße Verwendung ist durch den vorliegenden Stand der Technik weder neuheitsschädlich vorweggenommen noch daraus in naheliegender Weise ableitbar. Folglich erfüllt der Gegenstand der Ansprüche 1 - 9 die Erfordernisse der Art. 33(2) und (3) PCT.

**SEKTION VII:**

1. Im gegenwärtigen Wortlaut umfassen die unabhängigen Ansprüche 1 und 7 auch die Verwendung von Menschen als zu testendes Säugetier. Der PCT enthält zwar hinsichtlich des Schutzzumfangs des Terminus "(Säuge)-Tier" in Zusammenhang mit dessen Einsatz in technischen Verfahren und eines potentiellen Konflikts mit ethischen Grundsätzen keine einheitliche Richtlinien, eine medizinische oder industrielle Nutzung von Menschen muß jedoch gemäß der gängigen Rechtspraxis des EPA (Art. 53(a) EPÜ) im Anspruchswortlaut (z.B. anhand eines geeigneten Disclaimers) eindeutig ausgeschlossen sein.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ \_\_\_\_\_

**PCT**

**PCT Chapter II**  
**MU DG-2**

## ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:  
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

<b>Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG</b>		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2564 - sch/msl
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01797	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24. Juni 1998 (24.06.98)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 24. Juni 1997 (24.06.97)
Bezeichnung der Erfindung Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien		
<b>Feld Nr. II ANMELDER</b>		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 D-69120 Heidelberg		Telefonnr.:  Telefaxnr.:  Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  KÜPPER, Jan-Heiner Fliederstr. 3 D-69256 Mauer		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  BÜRKLE, Alexander Hans-Thoma-Str. 18 D-69181 Leimen		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

**Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER**

*Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.*

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

van GOOL, Leon  
Dompfaffenweg 6  
D-69123 Heidelberg

Staatsangehörigkeit (Staat):

NL

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

zus HAUSEN, Harald  
Eichenweg 1  
D-69483 Waldmichelbach

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):



Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

**Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT**

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Dr. Andrea Schübler  
Truderinger Str. 246  
D-81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐

Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

**Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN**

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde\*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

\* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

**Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN**

Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen .....

*(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*

**Feld Nr. VI KONTROLLISTE**

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- |                                          |   |         |
|------------------------------------------|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34            |   |         |
| Beschreibung                             | : | Blätter |
| Ansprüche                                | : | Blätter |
| Zeichnungen                              | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den               |   |         |
| Änderungen nach Artikel 34               | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19  | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln auführen) :         | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten                      nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

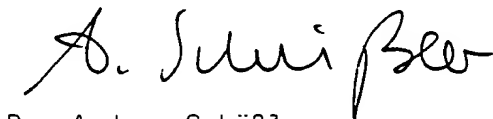
Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- |                                                                        |                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht        | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht            | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln auführen):     |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | V-Scheck Nr. 818934326                                                  |

**Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 22. Januar 1999



Dr. Andrea Schübler

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- |                                                                                                                                                                           |                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:                                                                                                                          |                                                                       |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):                                                                                   |                                                                       |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.                  | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.                                     |                                                                       |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCULDIGT. |                                                                       |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) **K 2564 - sch/msl**

### Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung der öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KÜPPER, Jan-Heiner  
Fliederstraße 3  
69256 Mauer

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Andrea Schübler  
Truderinger Str. 246  
81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p><b>BÜRKLE, Alexander</b>  <b>Hans-Thoma-Str. 18</b>  <b>69181 Leimen</b></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): <span style="float: right;">DE</span>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <span style="float: right;">DE</span>
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p><b>van GOOL, Leon</b>  <b>Dompfaffenweg 6</b>  <b>69123 Heidelberg</b></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): <span style="float: right;">NL</span>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <span style="float: right;">DE</span>
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p><b>zur HAUSEN, Harald</b>  <b>Eichenweg 1</b>  <b>69483 Waldmichelbach</b></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): <span style="float: right;">DE</span>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <span style="float: right;">DE</span>
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (*bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden*):

**Regionales Patent**

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*)

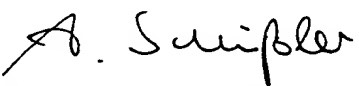
**Nationales Patent** (*falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben*):

- |                                                               |                                                                             |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien                          | <input type="checkbox"/> LT Litauen                                         |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien                          | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg                                       |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich                        | <input type="checkbox"/> LV Lettland                                        |
| <input type="checkbox"/> AU Australien                        | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau                                 |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan                      | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar                                      |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina               | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                          | <input type="checkbox"/> MN Mongolei                                        |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                          |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien                         | <input type="checkbox"/> MX Mexiko                                          |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus                           | <input type="checkbox"/> NO Norwegen                                        |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada                            | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland                                      |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein  | <input type="checkbox"/> PL Polen                                           |
| <input type="checkbox"/> CN China                             | <input type="checkbox"/> PT Portugal                                        |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba                              | <input type="checkbox"/> RO Rumänien                                        |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik             | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation                            |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland                       | <input type="checkbox"/> SD Sudan                                           |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark                          | <input type="checkbox"/> SE Schweden                                        |
| <input type="checkbox"/> EE Estland                           | <input type="checkbox"/> SG Singapur                                        |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien                           | <input type="checkbox"/> SI Slowenien                                       |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland                          | <input type="checkbox"/> SK Slowakei                                        |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich            | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                                    |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien                          | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan                                   |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                             | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan                                    |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia                            | <input type="checkbox"/> TR Türkei                                          |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau                     | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago                             |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn                            | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                                         |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda                                          |
| <input type="checkbox"/> IL Israel                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika       |
| <input type="checkbox"/> IS Island                            | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                  | <input type="checkbox"/> VN Vietnam                                         |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia                             | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien                                     |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan                       | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe                                        |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea                    |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan                        |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia                       |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                         |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia                           |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho                           |                                                                             |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH</b>		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>																											
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:																													
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)																										
(1) Deutschland (DE)	24. Juni 1997 (24.06.97)	197 26 824.2																											
(2)																													
(3)																													
<p><i>Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):</i></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) <u>1</u> bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.</p>																													
<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b>																													
<p><b>Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA)</b> (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll: Zweibuchstaben-Code genügt): <u>ISA /</u> <u>EPA</u></p> <p><b>Frühere Recherche:</b> Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.</p> <p>Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr) : _____ Aktenzeichen: _____</p>																													
<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE</b>																													
<p>Diese internationale Anmeldung umfaßt:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1. Antrag</td> <td>: 4</td> <td>Blätter</td> </tr> <tr> <td>2. Beschreibung</td> <td>: 9</td> <td>Blätter</td> </tr> <tr> <td>3. Ansprüche</td> <td>: 2</td> <td>Blätter</td> </tr> <tr> <td>4. Zusammenfassung</td> <td>: 1</td> <td>Blätter</td> </tr> <tr> <td>5. Zeichnungen</td> <td>: 1</td> <td>Blätter</td> </tr> <tr> <td><b>Insgesamt</b></td> <td><b>: 17</b></td> <td><b>Blätter</b></td> </tr> </table>		1. Antrag	: 4	Blätter	2. Beschreibung	: 9	Blätter	3. Ansprüche	: 2	Blätter	4. Zusammenfassung	: 1	Blätter	5. Zeichnungen	: 1	Blätter	<b>Insgesamt</b>	<b>: 17</b>	<b>Blätter</b>	<p>Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht</td> <td>5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung</td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht</td> <td>6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen</td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift</td> <td>7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)</td> </tr> <tr> <td>4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):</td> <td>8. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">Scheck, Text f. Priobeleg</p>		1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht	5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung	2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen	3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift	7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)	4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):	8. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):
1. Antrag	: 4	Blätter																											
2. Beschreibung	: 9	Blätter																											
3. Ansprüche	: 2	Blätter																											
4. Zusammenfassung	: 1	Blätter																											
5. Zeichnungen	: 1	Blätter																											
<b>Insgesamt</b>	<b>: 17</b>	<b>Blätter</b>																											
1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht	5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung																												
2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen																												
3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift	7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)																												
4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):	8. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):																												
Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.																													
<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>																													
<p><i>Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.</i></p> <p>München, 24. Juni 1998</p> <p></p> <p>Dr. Andrea Schüßler (Patentanwältin)</p>																													

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
<p>1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:</p> <p>3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:</p> <p>4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:</p>	<p>2. Zeichnungen</p> <p><input type="checkbox"/> eingegangen:</p> <p><input type="checkbox"/> nicht eingegangen:</p>
<p>5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: <u>ISA /</u></p>	<p>6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben</p>

Vom Internationalen Büro auszufüllen
<p>Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro: _____</p>

Unser Zeichen: K 2564 - hu / msl

### **Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien.

In Nahrungsmitteln, Kosmetika, Textilien, Werkstoffen, Chemikalien sowie anderen künstlichen Erzeugnissen, aber auch in der Natur, kommen eine Vielzahl bisher unbekannter Substanzen mit kanzerogenem Gefährdungspotential vor, deren Zahl sich durch ständige Neuentwicklungen erhöht. Darüber hinaus können auch physikalische Agenzien (z.B. Röntgenstrahlen, UV-Strahlung) Krebs auslösen. Zur Identifikation dieser Stoffe und Abschätzung ihres kanzerogenen Potentials wurden bisher verschiedene in-vivo und in-vitro Tests durchgeführt.

Der sehr weit verbreitete Ames-Test, auch Salmonella-typhimurium-Test genannt, beruht auf der Mutagenität von Substanzen in Bakterien (Clonfero et al., Med. Lav. 81, S. 3-10 (1990)). Ein ebenso bekannter in-vitro Test ist der SOS-Chromotest (Quillardet et al., Mutat. Res. 297, S. 235-279 (1993)), der auf der Induktion des bakteriellen SOS-Systems durch genotoxische Agenzien beruht. Beide Tests sind in ihrer Sensitivität vergleichbar, haben aber den grundsätzlichen Nachteil, daß die genotoxische Wirkungen von Substanzen in Bakterien und höheren Organismen unterschiedlich sein können und somit die Ergebnisse nicht auf den Säugetierorganismus übertragbar sind. Daher wurden vor wenigen Jahren der Micronucleus-Test (Miller et al., Environ. Mol. Mutagen. 26, S. 240-247 (1995)), der Einzel-Zell-Geltest (SCG-Test, auch Kometen-Assay genannt) und der Test auf Schwester-Chromosomen-Austausch (Hartmann et al., Mutat. Res. 346, S. 49-56 (1995)) entwickelt, die alle auf eukaryontischen Zellsystemen basieren.

Zur Untersuchung der mutagenen Wirkung von Substanzen oder physikalischen Agenzien in lebenden Organismen (in vivo) wurden Assays entwickelt, die auf

der Mutation bakterieller Reportergene (LacI- oder lac Z-Gen) beruhen, welche als Transgen in Mäuse eingebracht wurden (Gossen et al., Mutat. Res. 307, S. 451-459 (1994)). Daraus entstanden die sog. Muta-Maus sowie die Big-Blue-Maus.

Da die Tumorentstehung ein multifaktorieller und in allen Einzelheiten bisher nicht aufgeklärter Vorgang ist, sind Verfahren unzureichend, die nur einzelne Aspekte (z.B. Mutationserzeugung) der Tumorentstehung analysieren. Im Falle eines negativen Ergebnisses kann damit a priori die Kanzerogenität eines Stoffes oder physikalischen Agens nicht ausgeschlossen werden. Zudem sind die für den Genotoxizitätsnachweis von chemischen und physikalischen Agenzien zumeist verwendeten bakteriellen Systeme nur mit Einschränkungen auf höhere Organismen übertragbar. Es gilt daher festzuhalten, daß nach heutigem Stand der Technik nur die Tumorentstehung selbst ein sicherer Parameter ist, um das kanzerogene Gefährdungspotential eines chemischen oder physikalischen Agens zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden schon vor vielen Jahren direkte Kanzerogenitäts-Tests an Nagetieren eingeführt. Bei diesen in vielen Ländern für die Zulassung neuer Substanzen vorgeschriebenen Tests müssen jedoch oft sehr hohe Dosen der betreffenden Substanz appliziert werden, um keine falsch negativen Ergebnisse zu erhalten. Es wurde daher der wichtige Einwand erhoben, daß die erzielten positiven Ergebnisse nicht durch eine echte Kanzerogenität der Substanzen ausgelöst werden, sondern daß lediglich eine unspezifische Stimulierung der Zellteilung infolge der Überdosierung vorliegt. Erst durch diese mitogene Aktivierung würden Mutationen und in der Folge Krebs entstehen, so daß auch mit diesen Tests, die falsch positive Ergebnisse liefern, keine verlässlichen Ergebnisse über die Kanzerogenität von Substanzen erhalten werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem kanzerogene Agenzien zuverlässig identifiziert werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Verwendung eines Säugetiers, bevorzugt eines Nagetiers, besonders bevorzugt unter Verwendung einer Maus, durchgeführt, bei welchem eine Störung in der DNA-Reparatur vorliegt. Die Störung in der DNA-Reparatur basiert auf der trans-dominanten Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (abgekürzt PARP), einem an DNA-Reparaturvorgängen beteiligten Enzym. Die Hemmung der PARP beruht bevorzugt auf Expression einer dominant negativen Mutante der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, bevorzugt der transgenen Expression einer solchen Mutante in einem Säugetier, wodurch ein transgenes Tier entsteht, das auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Die PARP besitzt eine DNA-Bindungsdomäne (abgekürzt DBD), welche die Bindung an DNA-Strangbrüche ermöglicht und zu einer Enzymaktivität der PARP führt, wodurch eine Reparatur der Strangbrüche ermöglicht wird. Bei der dominant negativen PARP-Mutante liegt jedoch eine Deletion vor, so daß nur die DNA-Bindungsdomäne der PARP exprimiert wird. Dies bewirkt eine Hemmung der PARP-Enzymfunktion und damit der DNA-Reparatur. Die Expression dieser PARP-Mutante hat keinen Einfluß auf Zellteilung und Zellvitalität in Abwesenheit von genotoxischem Stress. Werden aber genotoxische (chemische oder physikalische) Agenzien appliziert, führt die PARP-Hemmung zu einer erheblichen Steigerung der Sensitivität der Zellen gegen diese Behandlungen. Die Anwesenheit der PARP-Mutante führt dann zu einer gesteigerten genetischen Instabilität nach Kanzerogenbehandlung, die sich in erhöhter Rekombination sowie verstärkter Genamplifikation äußert. Außerdem führt die Störung der PARP-Funktion zu einer gesteigerten Mutagenität genotoxischer Agentien. Damit führt die Störung der zellulären PARP-Funktion zu einer erhöhten Rate verschiedener genetischer Veränderungen (Mutationen, Rekombinationen, Genamplifikation) nach Behandlung mit einem Kanzerogen. Diese verschiedenen genetischen Veränderungen lassen, in Abhängigkeit von der Natur des kanzerogenen Agens und der Art seiner Applikation, verschiedene Wege der Tumorentstehung zu (z.B. Onkogenamplifikation, Tumorsuppressorgen-Mutation oder Kombinationen davon).

Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Säugetier, bevorzugt die

transgene Maus, hat vorteilhafterweise eine Haut-spezifische Expression der dominant-negativen PARP-Mutante, wobei selbstverständlich auch jede andere organspezifische Expression möglich ist. Die Haut ist aber wegen der guten Erreichbarkeit und Kontrollierbarkeit das bevorzugte Organ für Kanzerogenese-Untersuchungen. Zur Steuerung des Transgens kann jeder dem Fachmann bekannte Promotor, der eine gewebespezifische Expression, bevorzugt in der Haut, erlaubt, verwendet werden; bevorzugt wird der Zytokeratin-14-Promotor verwendet, der eine Expression in der zellteilungsaktiven Basalschicht gestattet, aus welcher bevorzugt Hauttumoren entstehen (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, S. 1563-1567 (1989)).

In bevorzugter Weise wird zur Herstellung des transgenen Säugetiers ein Fragment verwendet, das folgenden Aufbau hat (s. Fig. 1):

- 1,946 kB Aval-Fragment des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))
- 1,156 kB DBD-Fragment von Position -29 bis zur internen Nla IV-Stelle bei 1127 der humanen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (Cherney et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987))
- 0,486 kB des Polyadenylierungssignals des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))

Ein dieses Fragment enthaltender Vektor (pKDinoDBD) wurde am 11. Juni 1997 unter der Nummer DSM 11594 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) hinterlegt.

Das transgene Säugetier wird nach der von Hogan et al. ("Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1986)) allgemein beschriebenen Methode hergestellt. Dazu eignet sich besonders die Mikroinjektion eines entsprechenden DNA-Fragments in befruchtete Maus-Oozyten und nachfolgende Implantation in scheinträchtige Weibchen. Es

entstehen Nachkommen, die das Transgen enthalten und an ihre Nachkommen weitergegeben (DBD-Linie).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Form eines in-vivo-Assays durchgeführt. Es werden 10-15 Wochen alte transgene Tiere der DBD-Linie ausgesucht und für den Test entsprechend akklimatisiert. Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (weiblich oder männlich) benötigt. Da ein wichtiges Zielorgan der Kanzerogenesestudien die Haut ist, werden die potentiell kanzerogenen chemischen Agenzien in jeweils 50-200  $\mu$ l Lösungsmittel, z.B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Aceton oder Ethanol) zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Zur Untersuchung von potentiell karzinogenen physikalischen Agenzien werden entsprechende Applikationen ebenfalls zweimal pro Woche durchgeführt. Diese Behandlungen können bis zu 20 Wochen dauern. Um Tumorwachstum zu ermöglichen, wird eine zusätzliche Zeit von bis zu 40-80 Wochen nach der letzten Applikation veranschlagt. Als Positivkontrolle für die Tumorerzeugung kann 5-50  $\mu$ g 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in derselben Versuchsanordnung verwendet werden. Als Negativkontrolle kann das entsprechende Lösungsmittel, das auch zur Auflösung der Testsubstanz verwendet worden war, aufgetragen werden. Die Tiere werden während der gesamten Versuchszeit regelmäßig gewogen und die Applikationsstelle untersucht. Entstehende Papillome bzw. andere Hauttumoren werden einmal pro Woche makroskopisch untersucht und ggf. vermessen. Wenn Tumore eine kritische Größe erreicht haben (hängt von Tierart, Lage des Tumors und den nationalen Tierschutzbedingungen ab), werden die Tiere getötet und Tumorgewebe wird zur histologischen und molekularbiologischen Charakterisierung entnommen. Außerdem können Primärkulturen der Tumoren angelegt werden. Die Ergebnisse des Kanzerogenitätsversuche werden statistisch ausgewertet, wobei Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden können. Zur weiteren Analyse können Unterschiede der Tumorentstehung in den Geschlechtern sowie zu Wildtyp-Mäusen ermittelt werden. Weitere Einzelheiten zu in-vivo Kanzerogenitätsassays finden sich in Tennant et al., Environ. Health Perspect. 103, S. 942-950 (1995).



Im Vergleich zu allen in-vitro-Modellen, welche einzelne Vorgänge der Tumorentstehung herausgreifen (z.B. DNA-Schädigung, Mutationserzeugung) ist ein in-vivo-Assay aussagekräftiger, dessen biologischer Endpunkt die Tumorentstehung selbst ist. Im Vergleich zu dem oben beschriebenen direkten Kanzerogenitäts-Modell mit Nagetieren kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des transgenen Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch trans-dominante Hemmung der PARP-Aktivität aufweist, ein Sensitivitätsgewinn erzielt werden, wodurch das Problem der Überdosierung und Erzeugung falsch positiver Ergebnisse verringert wird. Im Gegensatz zu den bekannten transgenen Mausmodellen umgeht das Verfahren der vorliegenden Erfindung das Problem der Bahnung in Richtung einer vorgegebenen Tumorgenese. Die PARP-Hemmung führt zu einer grundlegenden Störung der DNA-Reparatur mit der Konsequenz einer Verstärkung der genetischen Instabilität (Mutations-, Rekombinations-, Genamplifikationsrate) nach Kanzerogenbehandlung, wodurch dann über verschiedene Wege die Tumorentstehung begünstigt wird.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1 zeigt das Expressionsfragment aus pKDinoDBD

K14-Prom.	=	Promotor des humanen Zytokeratin-14-Gens
DBD	=	kodierende Sequenz der DNA-Bindungsdomäne der humanen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (EC 2.4.2.30)
p-A	=	Polyadenylierungssignal des humanen Zytokeratin-14-Gens

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

**BEISPIEL 1: Herstellung der transgenen Mauslinie DBD # 354**

Das Plasmid pKDinoDBD (s. Fig. 1) wurde mit dem Restriktionsenzym Not I geschnitten. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem 1%igen Agarosegel wurde ein 3,6 kB großes Fragment, welches die Expressionskassette von pKDinoDBD enthielt, isoliert und mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (z.B. "Gene Clean"<sup>®</sup>; Dianova, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Dieses Fragment wurde auf eine Konzentration von 2 ng/ $\mu$ l in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,25 mM EDTA eingestellt. F1-Weibchen aus der Kreuzung der Mäusestämme C57BL/6 x DBA2 wurden durch Hormongaben einer Superovulation unterzogen. Nach der Verpaarung mit F1-Männchen (ebenfalls durch Kreuzung von C57BL/6 x DBA2) wurden befruchtete Eizellen aus den Weibchen präpariert, in die das vorstehend beschriebene DNA-Fragment mikroinjiziert wurde. Die Embryonen wurden in die Eileiter scheinträchtiger NMRI-Mäuse (Ammenmütter; zuvor verpaart mit vasektomierten Männchen) implantiert. Die nach ca. 21 Tagen geborenen Tiere wurden anhand von DNA-Material aus Schwanz-Biopsien auf Anwesenheit des Transgens überprüft. Dazu wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit folgenden Primern aus der kodierenden Sequenz der humanen PARP (Cherney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987)) eingesetzt:

5'-ATG GCG GAG TCT TCG GAT AAG CTC TA-3' (Primer 1, # 1-26)

5'-GCC AGG CGT GGC CGC CAC GGA GG-3' (Primer 2, # 1110-1088)

Es wurden 22 PCR-Zyklen mit jeweils 200 ng genomischer DNA durchgeführt, wobei jeweils 300 sec. bei 95°C denaturiert, 60 sec. bei 60°C angelagert und 120 sec. bei 72°C polymerisiert wurde.

Ein positives Weibchen (Ohrmarke #354) wurde identifiziert. Aus der Schwanz-Biopsie dieses Tieres wurde Protein-Material gewonnen und mittels Western Blot auf Expression des Transgens untersucht. Dabei wurden sowohl der monoklonale anti-DBD-Antikörper CII10 (Lamarre et al., Biochim. Biophys. Acta 950, S.

147-160 (1988)) als auch das gegen die DBD gerichtete anti-FII-Kaninchenserum (Küpper et al., J. Biol. Chem. 265, S. 18721-18724 (1990)) eingesetzt. Mit beiden Antikörpern war die 45 kDa große DNA-Bindungsdomäne (DBD) im Western Blot nachweisbar, so daß der Beweis für die Expression des Transgens erbracht wurde. Die Founder-DBD-Maus #354 wurde mit DBA2-Männchen verpaart und die Nachkommenschaft analysiert. Das Transgen wird an die Nachkommen weitergegeben, so daß die Linie DBD #354 stabil vorhanden ist.

**BEISPIEL 2:            Identifizierung des kanzerogenen Potentials von fünf verschiedenen Chemikalien**

12 Wochen alte Tiere der in Beispiel 1 beschriebenen Maus-DBD-Linie #354 werden über drei Wochen einer Akklimatisation an den Versuchsort unterzogen. Weibliche Tiere werden in Gruppen zu jeweils 5 Tieren/Käfig, männliche Tiere werden einzeln unter spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bedingungen gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgt nach Standard (#D10010 Futter von Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA sowie Wasser ad libitum). Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (männlich oder weiblich) benötigt. Die zu testenden putativ karzinogenen Chemikalien werden in mehreren Verdünnungsstufen in physiologischer Kochsalzlösung bzw. Aceton aufgenommen und 100 µl jeder Verdünnung jeweils zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Als Positivkontrolle werden 20 µg 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in 100 µl Aceton verwendet. Als Negativkontrolle wird Aceton appliziert. Die Behandlung wird für 15 Wochen durchgeführt. Die Tiere werden wöchentlich gewogen und an der Applikationsstelle untersucht. 12 Wochen nach Ende der Behandlungen kann in der Gruppe der Positivkontrolle mit einem sichtbaren Tumorwachstum gerechnet werden, wobei erfahrungsgemäß die Tumoren rasch (innerhalb weiterer 12 Wochen) an Größe zunehmen. Nach Erreichen einer kritischen Tumorgöße werden die Tiere jeweils durch zervikale Dislokation getötet und der Tumor entnommen. Erwartungsgemäß zeigt sich in der Gruppe der mit Lösungsmittel-behandelten Tiere auch nach 60 Wochen kein Tumorwachstum.

Alternativ kann ein sogenanntes Initiations-Promotionsprotokoll zur Anwendung kommen. Im Prinzip wird hierbei einmalig eine sehr niedrige Dosis eines initiierenden (zumeist DNA-schädigenden) Karzinogens verabreicht, gefolgt von wiederholten Anwendungen eines für sich allein nicht-karzinogenen Tumorpromotors (Becker et al., Cancer Res. 56, S. 3244-3249, 1996). Hier wird als Positivkontrolle beispielsweise Methylnitrosoharnstoff ( $20 \mu\text{mol}$  in  $100 \mu\text{l}$  Aceton; einmalig topisch appliziert) verwendet. Sieben Tage später wird dann mit dem Tumorpromotor Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen weiterbehandelt (je  $10 \text{ mmol}$  in  $100 \mu\text{l}$  Aceton). Negativkontrollen sind hier Tiere, die anstelle des Methylnitrosoharnstoff lediglich Aceton erhalten haben, dann jedoch gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Die auf Kanzerogenität zu testenden Chemikalien werden ebenfalls anstelle des Methylnitrosoharnstoffs appliziert, wiederum gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Bei diesem Protokoll ist bei der Positivkontrolle nach spätestens 9 Wochen mit einem sichtbaren Tumorwachstum bei in Beispiel 1 beschriebenen Maus der DBD-Linie #354 zu rechnen.

### Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch einen transgenen Eingriff vorgenommen wird.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Säugetier eine transgene Maus verwendet wird.
- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verabreichung der potentiell kanzerogenen Agentien durch topische Applikation erfolgt.
- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Säugetier das in Fig. 1 gezeigte DNA-Konstrukt transgen exprimiert.
- 7) Verwendung eines Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 8) Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.

- 9) Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei es sich bei dem Säugetier um eine transgene Maus handelt.

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agentien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.

## Expressionskassette

### Vektor-Anteil

Fig. 1



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Patentanwältin  
Dr. Andrea Schüpfer  
Truderinger Str. 246  
81825 München

Absender:

ANMELDEAMT  
wie unten angegeben

EINGEGANGEN

09. JULI 1998

Mitteilung über den Eingang von Unterlagen  
einer vorgeblichen internationalen Anmeldung  
gemäß PCT Verwaltungsrichtlinien Abschnitt 301

Erted. ....

ABSENDEDATUM beim Anmeldeamt

02. Juli 1998

Name und Anschrift des Anwalts, falls kein Anwalt, des Anmelders

AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS

K 2564 - scl/msl

KENNZEICHNUNG DER VORGEBLICHEN INTERNATIONALEN ANMELDUNG

Internationales Aktenzeichen

Bezeichnung der Erfindung

PCT/DE

PCT/DE 98 / 01797

Verfahren zur Identifizierung Kanzerogener...

Anmelder (Name)

Deutsches Krebsforschungszentrum

MITTEILUNG

Hiermit wird dem Anmelder mitgeteilt, daß beim Anmeldeamt am

24. Juni 1998

(Eingangsdatum der Unterlagen)

Unterlagen eingegangen sind, die eine internationale Anmeldung darstellen sollen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß diese Unterlagen vom Anmeldeamt in Bezug auf die Erfordernisse von Artikel 11 Absatz 1, d.h. auf ihre Übereinstimmung mit den Erfordernissen für die Zuerkennung des internationalen Anmeldedatums, noch nicht geprüft worden sind.

Den Unterlagen ist vorläufig das oben angegebene internationale Aktenzeichen zugewiesen worden. Der Anmelder wird hiermit aufgefordert, im Schriftverkehr mit dem Anmeldeamt auf dieses Aktenzeichen Bezug zu nehmen.

DAS ANMELDEAMT

Deutsches Patentamt  
80297 München

Fax: 089 / 2195 - 22 21

Bevollmächtigter Bediensteter:

Beze

Tel.: 089 / 2195 - 22 68

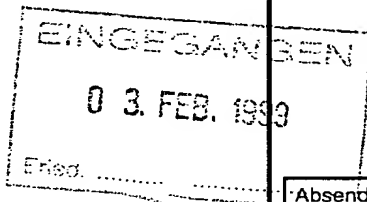
# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

## PCT

An  
SCHÜSSLER, Andrea  
Truderinger Strasse 246  
D-81825 München  
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES  
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS  
ODER DER ERKLÄRUNG



(Regel 44.1 PCT)

*1.4.99 not. by ✓*

Absenddatum  
(Tag/Monat/Jahr)

01/02/1999

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

K 2564 - sch/msl

**WEITERES VORGEHEN**

siehe Punkt 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01797

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

24/06/1998

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

**Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:**

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

**Bis wann sind Änderungen einzureichen?**

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

**Wo sind die Änderungen einzureichen?**

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,  
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüros dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90 bis 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüros vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andria Overbeeke-Siepkens

## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

### HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

#### Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

#### Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

#### Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

#### In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu nummerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

#### Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

##### Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (F rsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:  
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:  
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:  
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:  
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

### "Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

### Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

### Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

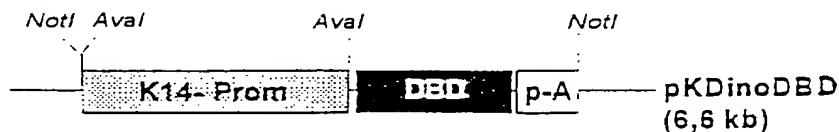


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/00, A01K 67/027, C12Q 1/68, C12N 9/10, 15/54</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/59069</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01797 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Juni 1998 (24.06.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 26 824.2 24. Juni 1997 (24.06.97) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜPPER, Jan-Heiner [DE/DE]; Fliederstrasse 3, D-69256 Mauer (DE). BÜRKLE, Alexander [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 18, D-69181 Leimen (DE). VAN GOOL, Leon [NL/DE]; Dompfaffenweg 6, D-69123 Heidelberg (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Eichenweg 1, D-69483 Waldmichelbach (DE).  (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.  (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 29. April 1999 (29.04.99)	

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING CANCERIGENIC AGENTS USING A MAMMAL WITH INHIBITION OF THE  
POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE

(54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG KANZEROGENER AGENZIEN DURCH SÄUGETIER MIT HEMMUNG DER POLY (ADP-  
RIBOSE) POLYMERASE



1 kb

EXPRESSION CASSETTE  
Expressionskassette

Vektor-Anteil  
VECTOR PROPORTION

(57) Abstract

In a process for identifying cancerogenic agents, the potentially cancerogenic agents are administered to a mammal with a DNA repair disturbance caused by inhibiting the poly(ADP-ribose)-polymerase.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien.

In Nahrungsmitteln, Kosmetika, Textilien, Werkstoffen, Chemikalien sowie anderen künstlichen Erzeugnissen, aber auch in der Natur, kommen eine Vielzahl bisher unbekannter Substanzen mit kanzerogenem Gefährdungspotential vor, deren Zahl sich durch ständige Neuentwicklungen erhöht. Darüber hinaus können auch physikalische Agenzien (z.B. Röntgenstrahlen, UV-Strahlung) Krebs auslösen. Zur Identifikation dieser Stoffe und Abschätzung ihres kanzerogenen Potentials wurden bisher verschiedene in-vivo und in-vitro Tests durchgeführt.

Der sehr weit verbreitete Ames-Test, auch Salmonella-typhimurium-Test genannt, beruht auf der Mutagenität von Substanzen in Bakterien (Clonfero et al., Med. Lav. 81, S. 3-10 (1990)). Ein ebenso bekannter in-vitro Test ist der SOS-Chromotest (Quillardet et al., Mutat. Res. 297, S. 235-279 (1993)), der auf der Induktion des bakteriellen SOS-Systems durch genotoxische Agenzien beruht. Beide Tests sind in ihrer Sensitivität vergleichbar, haben aber den grundsätzlichen Nachteil, daß die genotoxische Wirkungen von Substanzen in Bakterien und höheren Organismen unterschiedlich sein können und somit die Ergebnisse nicht auf den Säugetierorganismus übertragbar sind. Daher wurden vor wenigen Jahren der Micronucleus-Test (Miller et al., Environ. Mol. Mutagen. 26, S. 240-247 (1995)), der Einzel-Zell-Geltest (SCG-Test, auch Kometen-Assay genannt) und der Test auf Schwester-Chromosomen-Austausch (Hartmann et al., Mutat. Res. 346, S. 49-56 (1995)) entwickelt, die alle auf eukaryontischen Zellsystemen basieren.

Zur Untersuchung der mutagenen Wirkung von Substanzen oder physikalischen Agenzien in lebenden Organismen (in vivo) wurden Assays entwickelt, die auf

der Mutation bakterieller Reportergene (LacI- oder lac Z-Gen) beruhen, welche als Transgen in Mäuse eingebracht wurden (Gossen et al., Mutat. Res. 307, S. 451-459 (1994)). Daraus entstanden die sog. Muta-Maus sowie die Big-Blue-Maus.

Da die Tumorentstehung ein multifaktorieller und in allen Einzelheiten bisher nicht aufgeklärter Vorgang ist, sind Verfahren unzureichend, die nur einzelne Aspekte (z.B. Mutationserzeugung) der Tumorentstehung analysieren. Im Falle eines negativen Ergebnisses kann damit a priori die Kanzerogenität eines Stoffes oder physikalischen Agens nicht ausgeschlossen werden. Zudem sind die für den Genotoxizitätsnachweis von chemischen und physikalischen Agenzien zumeist verwendeten bakteriellen Systeme nur mit Einschränkungen auf höhere Organismen übertragbar. Es gilt daher festzuhalten, daß nach heutigem Stand der Technik nur die Tumorentstehung selbst ein sicherer Parameter ist, um das kanzerogene Gefährdungspotential eines chemischen oder physikalischen Agens zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden schon vor vielen Jahren direkte Kanzerogenitäts-Tests an Nagetieren eingeführt. Bei diesen in vielen Ländern für die Zulassung neuer Substanzen vorgeschriebenen Tests müssen jedoch oft sehr hohe Dosen der betreffenden Substanz appliziert werden, um keine falsch negativen Ergebnisse zu erhalten. Es wurde daher der wichtige Einwand erhoben, daß die erzielten positiven Ergebnisse nicht durch eine echte Kanzerogenität der Substanzen ausgelöst werden, sondern daß lediglich eine unspezifische Stimulierung der Zellteilung infolge der Überdosierung vorliegt. Erst durch diese mitogene Aktivierung würden Mutationen und in der Folge Krebs entstehen, so daß auch mit diesen Tests, die falsch positive Ergebnisse liefern, keine verlässlichen Ergebnisse über die Kanzerogenität von Substanzen erhalten werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem kanzerogene Agenzien zuverlässig identifiziert werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.



Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Verwendung eines Säugetiers, bevorzugt eines Nagetiers, besonders bevorzugt unter Verwendung einer Maus, durchgeführt, bei welchem eine Störung in der DNA-Reparatur vorliegt. Die Störung in der DNA-Reparatur basiert auf der trans-dominanten Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (abgekürzt PARP), einem an DNA-Reparaturvorgängen beteiligten Enzym. Die Hemmung der PARP beruht bevorzugt auf Expression einer dominant negativen Mutante der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, bevorzugt der transgenen Expression einer solchen Mutante in einem Säugetier, wodurch ein transgenes Tier entsteht, das auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Die PARP besitzt eine DNA-Bindungsdomäne (abgekürzt DBD), welche die Bindung an DNA-Strangbrüche ermöglicht und zu einer Enzymaktivität der PARP führt, wodurch eine Reparatur der Strangbrüche ermöglicht wird. Bei der dominant negativen PARP-Mutante liegt jedoch eine Deletion vor, so daß nur die DNA-Bindungsdomäne der PARP exprimiert wird. Dies bewirkt eine Hemmung der PARP-Enzymfunktion und damit der DNA-Reparatur. Die Expression dieser PARP-Mutante hat keinen Einfluß auf Zellteilung und Zellvitalität in Abwesenheit von genotoxischem Stress. Werden aber genotoxische (chemische oder physikalische) Agenzien appliziert, führt die PARP-Hemmung zu einer erheblichen Steigerung der Sensitivität der Zellen gegen diese Behandlungen. Die Anwesenheit der PARP-Mutante führt dann zu einer gesteigerten genetischen Instabilität nach Kanzerogenbehandlung, die sich in erhöhter Rekombination sowie verstärkter Genamplifikation äußert. Außerdem führt die Störung der PARP-Funktion zu einer gesteigerten Mutagenität genotoxischer Agentien. Damit führt die Störung der zellulären PARP-Funktion zu einer erhöhten Rate verschiedener genetischer Veränderungen (Mutationen, Rekombinationen, Genamplifikation) nach Behandlung mit einem Kanzerogen. Diese verschiedenen genetischen Veränderungen lassen, in Abhängigkeit von der Natur des kanzerogenen Agens und der Art seiner Applikation, verschiedene Wege der Tumorentstehung zu (z.B. Onkogenamplifikation, Tumorsuppressorgen-Mutation oder Kombinationen davon).

Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Säugetier, bevorzugt die

transgene Maus, hat vorteilhafterweise eine Haut-spezifische Expression der dominant-negativen PARP-Mutante, wobei selbstverständlich auch jede andere organspezifische Expression möglich ist. Die Haut ist aber wegen der guten Erreichbarkeit und Kontrollierbarkeit das bevorzugte Organ für Kanzerogenese-Untersuchungen. Zur Steuerung des Transgens kann jeder dem Fachmann bekannte Promotor, der eine gewebespezifische Expression, bevorzugt in der Haut, erlaubt, verwendet werden; bevorzugt wird der Zytokeratin-14-Promotor verwendet, der eine Expression in der zellteilungsaktiven Basalschicht gestattet, aus welcher bevorzugt Hauttumoren entstehen (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, S. 1563-1567 (1989)).

in bevorzugter Weise wird zur Herstellung des transgenen Säugetiers ein Fragment verwendet, das folgenden Aufbau hat (s. Fig. 1):

- 1,946 kB Aval-Fragment des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))
- 1,156 kB DBD-Fragment von Position -29 bis zur internen Nla IV-Stelle bei 1127 der humanen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (Cherney et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987))
- 0,486 kB des Polyadenylierungssignals des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))

Ein dieses Fragment enthaltender Vektor (pKDinoDBD) wurde am 11. Juni 1997 unter der Nummer DSM 11594 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) hinterlegt.

Das transgene Säugetier wird nach der von Hogan et al. ("Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1986)) allgemein beschriebenen Methode hergestellt. Dazu eignet sich besonders die Mikroinjektion eines entsprechenden DNA-Fragments in befruchtete Maus-Oozyten und nachfolgende Implantation in scheinträchtige Weibchen. Es

entstehen Nachkommen, die das Transgen enthalten und an ihre Nachkommen weitergegeben (DBD-Linie).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Form eines in-vivo-Assays durchgeführt. Es werden 10-15 Wochen alte transgene Tiere der DBD-Linie ausgesucht und für den Test entsprechend akklimatisiert. Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (weiblich oder männlich) benötigt. Da ein wichtiges Zielorgan der Kanzerogenesestudien die Haut ist, werden die potentiell kanzerogenen chemischen Agenzien in jeweils 50-200  $\mu$ l Lösungsmittel, z.B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Aceton oder Ethanol) zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Zur Untersuchung von potentiell karzinogenen physikalischen Agenzien werden entsprechende Applikationen ebenfalls zweimal pro Woche durchgeführt. Diese Behandlungen können bis zu 20 Wochen dauern. Um Tumorwachstum zu ermöglichen, wird eine zusätzliche Zeit von bis zu 40-80 Wochen nach der letzten Applikation veranschlagt. Als Positivkontrolle für die Tumorerzeugung kann 5-50  $\mu$ g 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in derselben Versuchsanordnung verwendet werden. Als Negativkontrolle kann das entsprechende Lösungsmittel, das auch zur Auflösung der Testsubstanz verwendet worden war, aufgetragen werden. Die Tiere werden während der gesamten Versuchszeit regelmäßig gewogen und die Applikationsstelle untersucht. Entstehende Papillome bzw. andere Hauttumoren werden einmal pro Woche makroskopisch untersucht und ggf. vermessen. Wenn Tumore eine kritische Größe erreicht haben (hängt von Tierart, Lage des Tumors und den nationalen Tierschutzbedingungen ab), werden die Tiere getötet und Tumorgewebe wird zur histologischen und molekularbiologischen Charakterisierung entnommen. Außerdem können Primärkulturen der Tumoren angelegt werden. Die Ergebnisse des Kanzerogenitätsversuche werden statistisch ausgewertet, wobei Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden können. Zur weiteren Analyse können Unterschiede der Tumorentstehung in den Geschlechtern sowie zu Wildtyp-Mäusen ermittelt werden. Weitere Einzelheiten zu in-vivo Kanzerogenitätsassays finden sich in Tennant et al., Environ. Health Perspect. 103, S. 942-950 (1995).

Im Vergleich zu allen in-vitro-Modellen, welche einzelne Vorgänge der Tumorentstehung herausgreifen (z.B. DNA-Schädigung, Mutationserzeugung) ist ein in-vivo-Assay aussagekräftiger, dessen biologischer Endpunkt die Tumorentstehung selbst ist. Im Vergleich zu dem oben beschriebenen direkten Kanzerogenitäts-Modell mit Nagetieren kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des transgenen Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch trans-dominante Hemmung der PARP-Aktivität aufweist, ein Sensitivitätsgewinn erzielt werden, wodurch das Problem der Überdosierung und Erzeugung falsch positiver Ergebnisse verringert wird. Im Gegensatz zu den bekannten transgenen Mausmodellen umgeht das Verfahren der vorliegenden Erfindung das Problem der Bahnung in Richtung einer vorgegebenen Tumorgenese. Die PARP-Hemmung führt zu einer grundlegenden Störung der DNA-Reparatur mit der Konsequenz einer Verstärkung der genetischen Instabilität (Mutations-, Rekombinations-, Genamplifikationsrate) nach Kanzerogenbehandlung, wodurch dann über verschiedene Wege die Tumorentstehung begünstigt wird.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1 zeigt das Expressionsfragment aus pKDinoDBD.

K14-Prom.	=	Promotor des humanen Zytokeratin-14-Gens
DBD	=	kodierende Sequenz der DNA-Bindungsdomäne der humanen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (EC 2.4.2.30)
p-A	=	Polyadenylierungssignal des humanen Zytokeratin-14-Gens

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

**BEISPIEL 1: Herstellung der transgenen Mauslinie DBD # 354**

Das Plasmid pKDinoDBD (s. Fig. 1) wurde mit dem Restriktionsenzym Not I geschnitten. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem 1%igen Agarosegel wurde ein 3,6 kB großes Fragment, welches die Expressionskassette von pKDinoDBD enthielt, isoliert und mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (z.B. "Gene Clean"<sup>®</sup>; Dianova, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Dieses Fragment wurde auf eine Konzentration von 2 ng/ $\mu$ l in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,25 mM EDTA eingestellt. F1-Weibchen aus der Kreuzung der Mäusestämme C57BL/6 x DBA2 wurden durch Hormongaben einer Superovulation unterzogen. Nach der Verpaarung mit F1-Männchen (ebenfalls durch Kreuzung von C57BL/6 x DBA2) wurden befruchtete Eizellen aus den Weibchen präpariert, in die das vorstehend beschriebene DNA-Fragment mikroinjiziert wurde. Die Embryonen wurden in die Eileiter scheinträchtiger NMRI-Mäuse (Ammenmütter; zuvor verpaart mit vasktomierten Männchen) implantiert. Die nach ca. 21 Tagen geborenen Tiere wurden anhand von DNA-Material aus Schwanz-Biopsien auf Anwesenheit des Transgens überprüft. Dazu wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit folgenden Primern aus der kodierenden Sequenz der humanen PARP (Cherney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987)) eingesetzt:

5'-ATG GCG GAG TCT TCG GAT AAG CTC TA-3' (Primer 1, # 1-26)

5'-GCC AGG CGT GGC CGC CAC GGA GG-3' (Primer 2, # 1110-1088)

Es wurden 22 PCR-Zyklen mit jeweils 200 ng genomischer DNA durchgeführt, wobei jeweils 300 sec. bei 95°C denaturiert, 60 sec. bei 60°C angelagert und 120 sec. bei 72°C polymerisiert wurde.

Ein positives Weibchen (Ohrmarke #354) wurde identifiziert. Aus der Schwanz-Biopsie dieses Tieres wurde Protein-Material gewonnen und mittels Western Blot auf Expression des Transgens untersucht. Dabei wurden sowohl der monoklonale anti-DBD-Antikörper CII10 (Lamarre et al., Biochim. Biophys. Acta 950, S.

147-160 (1988)) als auch das gegen die DBD gerichtete anti-FII-Kaninchenserum (Küpper et al., J. Biol. Chem. 265, S. 18721-18724 (1990)) eingesetzt. Mit beiden Antikörpern war die 45 kDa große DNA-Bindungsdomäne (DBD) im Western Blot nachweisbar, so daß der Beweis für die Expression des Transgens erbracht wurde. Die Founder-DBD-Maus #354 wurde mit DBA2-Männchen verpaart und die Nachkommenschaft analysiert. Das Transgen wird an die Nachkommen weitergegeben, so daß die Linie DBD #354 stabil vorhanden ist.

**BEISPIEL 2: Identifizierung des kanzerogenen Potentials von fünf verschiedenen Chemikalien**

12 Wochen alte Tiere der in Beispiel 1 beschriebenen Maus-DBD-Linie #354 werden über drei Wochen einer Akklimation an den Versuchsort unterzogen. Weibliche Tiere werden in Gruppen zu jeweils 5 Tieren/Käfig, männliche Tiere werden einzeln unter spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bedingungen gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgt nach Standard (#D10010 Futter von Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA sowie Wasser ad libitum). Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (männlich oder weiblich) benötigt. Die zu testenden putativ karzinogenen Chemikalien werden in mehreren Verdünnungsstufen in physiologischer Kochsalzlösung bzw. Aceton aufgenommen und 100 µl jeder Verdünnung jeweils zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Als Positivkontrolle werden 20 µg 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in 100 µl Aceton verwendet. Als Negativkontrolle wird Aceton appliziert. Die Behandlung wird für 15 Wochen durchgeführt. Die Tiere werden wöchentlich gewogen und an der Applikationsstelle untersucht. 12 Wochen nach Ende der Behandlungen kann in der Gruppe der Positivkontrolle mit einem sichtbaren Tumorwachstum gerechnet werden, wobei erfahrungsgemäß die Tumoren rasch (innerhalb weiterer 12 Wochen) an Größe zunehmen. Nach Erreichen einer kritischen Tumorgöße werden die Tiere jeweils durch zervikale Dislokation getötet und der Tumor entnommen. Erwartungsgemäß zeigt sich in der Gruppe der mit Lösungsmittel-behandelten Tiere auch nach 60 Wochen kein Tumorwachstum.

Alternativ kann ein sogenanntes Initiations-Promotionsprotokoll zur Anwendung kommen. Im Prinzip wird hierbei einmalig eine sehr niedrige Dosis eines initiierenden (zumeist DNA-schädigenden) Karzinogens verabreicht, gefolgt von wiederholten Anwendungen eines für sich allein nicht-karzinogenen Tumorpromotors (Becker et al., Cancer Res. 56, S. 3244-3249, 1996). Hier wird als Positivkontrolle beispielsweise Methylnitrosoharnstoff ( $20 \mu\text{mol}$  in  $100 \mu\text{l}$  Aceton; einmalig topisch appliziert) verwendet. Sieben Tage später wird dann mit dem Tumorpromotor Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen weiterbehandelt (je  $10 \text{ mmol}$  in  $100 \mu\text{l}$  Aceton). Negativkontrollen sind hier Tiere, die anstelle des Methylnitrosoharnstoff lediglich Aceton erhalten haben, dann jedoch gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Die auf Kanzerogenität zu testenden Chemikalien werden ebenfalls anstelle des Methylnitrosoharnstoffs appliziert, wiederum gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Bei diesem Protokoll ist bei der Positivkontrolle nach spätestens 9 Wochen mit einem sichtbaren Tumorwachstum bei in Beispiel 1 beschriebenen Maus der DBD-Linie #354 zu rechnen.

**Patentansprüche**

- 1) Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch einen transgenen Eingriff vorgenommen wird.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Säugetier eine transgene Maus verwendet wird.
- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verabreichung der potentiell kanzerogenen Agentien durch topische Applikation erfolgt.
- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Säugetier das in Fig. 1 gezeigte DNA-Konstrukt transgen exprimiert.
- 7) Verwendung eines Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 8) Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.



- 9) Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei es sich bei dem Säugetier um eine transgene Maus handelt.

1/1

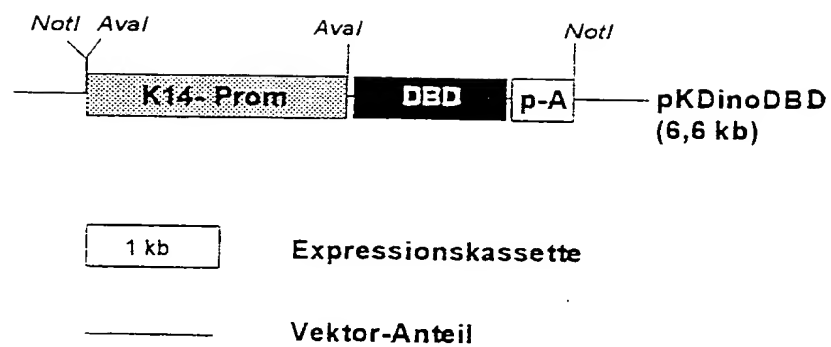


Fig. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1st Application No

PO/DE 98/01797

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/00 A01K67/027 C12Q1/68 C12N9/10 C12N15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;BUERKLE ALEXANDER (DE); ZUR HAUSEN HARALD ( ) 20 June 1996 see the whole document ---	1
A	KÜPPER, J.H. ET AL.: "Trans-dominant inhibition of poly(ADP-Ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-Nitro-N-nitroguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 6, pages 3154-3163, XP002090237 WASHINGTON US see the whole document ---	1

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 1999

Date of mailing of the international search report

01/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KÜPPER, J.H. ET AL.: "Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen-induced gene amplification in SV40-transformed Chinese Hamster cells "</p> <p>CANCER RESEARCH, vol. 56, no. 12, 15 June 1996; pages 2715-2717, XP002090238 MD US see the whole document</p>	1
A	<p>MOLINETE, M. ET AL.: "Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells"</p> <p>EMBO JOURNAL, vol. 12, no. 5, 1993, pages 2109-2117, XP002090239 EYNHAM, OXFORD GB see the whole document</p>	1
A	<p>DE 44 33 130 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21 March 1996 see the whole document</p>	1
A	<p>WO 95 24379 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;GRIFFIN ROGER JOHN (GB); CALVERT ALAN HI) 14 September 1995 see the whole document</p>	1
A	<p>EP 0 757 102 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 5 February 1997 see the whole document</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9618737 A	20-06-1996	DE 4444949 C EP 0871742 A JP 10510160 T	21-11-1996 21-10-1998 06-10-1998
DE 4433130 A	21-03-1996	W0 9608571 A EP 0726959 A JP 9507757 T	21-03-1996 21-08-1996 12-08-1997
W0 9524379 A	14-09-1995	AU 693167 B AU 1856595 A CA 2184747 A CN 1143358 A EP 0749415 A EP 0879820 A JP 9510704 T US 5756510 A	25-06-1998 25-09-1995 14-09-1995 19-02-1997 27-12-1996 25-11-1998 28-10-1997 26-05-1998
EP 0757102 A	05-02-1997	AU 6739896 A CA 2200496 A W0 9706267 A EP 0795019 A	05-03-1997 20-02-1997 20-02-1997 17-09-1997